Über die Sulfonierung von Polypeptiden und Dioxopiperazinen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der

Philosophischen Fakultät

der

Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Else Dammann

aus Berlin.

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juni 1932.

Tag der Promotion: 25. Juli 1932.

Würzburg 1932

Buchdruckerei Konrad Triltsch

395

Referenten:

Prof. Dr. Schlenk,

Privatdozent Dr. Baumgarten.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Theoretischer Teil.

Wegen ihrer ausschlaggebenden Bedeutung für alle biologischen Vorgänge ist von jeher die Erkenntnis der Konstitution der Eiweißstoffe Aufgabe und Ziel der chemischen Forschung gewesen. Bei den Proteïnen handelt es sich um hochmolekulare Stoffe von sicherlich sehr kompliziertem Molekülbau; ihre experimentelle Bearbeitung gestaltet sich daher äußerst schwierig. Die einfachsten Strukturelemente des Eiweißmoleküls sind bekanntlich die Aminosäuren, welche man als Endprodukte des hydrolytischen Abbaus mittels Säuren, Alkalien oder Enzymen erhält. Es erhebt sich nun die Frage nach der Art und Weise der Verknüpfung der einzelnen Bausteine untereinander. Auf Grund zahlreicher Untersuchungen sind verschiedene Theorien für die strukturelle Bindung der Aminosäuren im Eiweißmolekül aufgestellt worden. Wie vornehmlich durch die Arbeiten von E. Fischer wahrscheinlich gemacht wurde, besteht diese Bindung in einer Verkettung der einzelnen Aminosäuren durch die Säureamidbindung CO-NH, wie diese durch Vereinigung der Carboxylgruppe der einen mit der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure unter Wasseraustritt zustande kommt, eine Bindung, die man in diesem speziellen Falle als polypeptidartig bezeichnet. In neueren Arbeiten wird auch die Frage behandelt, ob außer den polypeptidartigen Verknüpfungen im Proteïnmolekül noch andere Möglichkeiten seines Aufbaues gegeben sind. Nach den Anschauungen einiger Forscher sollen vor allem Dioxopiperazine als Strukturelemente des Proteïnmoleküls in Frage kommen. Als Stütze für diese Ansicht wird das Auftreten von Dioxopiperazinen bei der partiellen Hydrolyse des Eiweißes herangezogen[1]). Jedoch darf wohl dieses Auftreten nicht als vollgültiger Beweis des Vorkommens von Dioxopiperazinen im ursprünglichen Proteïnmolekül gewertet werden. Denn es ist ja immerhin möglich, daß sich die Dioxopiperazine erst sekundär beim Abbau der Eiweißstoffe gebildet haben[2]). Aus diesem Grunde dürfen auch die Dioxopiperazine nicht so ohne weiteres an die Stelle von Polypeptiden gesetzt werden, was indessen die Möglichkeit, daß Dioxopiperazine in bestimmten Eiweißklassen, z. B. in den Proteïnoiden, am Aufbau beteiligt sind, keineswegs ausschließt.

Außer den Abbaureaktionen hat man hauptsächlich noch die verschiedensten Substitutionsreaktionen herangezogen, um einen tieferen

[1]) E. Fischer, B. **39**, 754(06); B. **40**, 3544(07).
Abderhalden und Mitarbeiter, Z. physiol. Ch. **62**, 315(09); **128**, 122(23); **132**, 1(24); **134**, 115(24); **145**, 310(25); **154**, 18(26).

[2]) P. Brigl, Z. physiol. Ch. **134**, 121(24); **139**, 147(24); **148**, 256(25); B. **56**, 1837(23).

Einblick in die Struktur des Eiweißmoleküls zu gewinnen. Durch Einführung charakteristischer Substituenten in das Eiweißmolekül lassen sich die darin freiliegenden reaktionsfähigen Gruppen erkennen und möglicherweise auch quantitativ bestimmen. Die wichtigsten dieser Methoden waren bisher: Nitrierung, Halogenierung, Methylierung, die verschiedenen Acylierungen, wie Acetylierung und Benzoylierung, auch Phosphorylierung.

Kossel und Fürth [3]) haben Eiweißstoffe nitriert und einige der Nitrosubstitutionsprodukte isoliert. Bei der Nitrierung von Protaminen z. B. konnte Kossel [4]) zeigen, daß nur der Guanidinrest des Arginins, das am Aufbau der Protamine vorwiegend beteiligt ist, nitriert wird. Er schließt daraus, daß die Guanidingruppe des Arginins in den Protaminen frei liegt und daß daher die polypeptidartige Bindung durch die Aminogruppe des Arginins bedingt sein muß. Auch kann man durch die Nitrierung die Gegenwart aromatischer Kerne in den Eiweißstoffen erkennen. Behandelt man sie nämlich mit Salpetersäure, so tritt Gelbfärbung auf, eine Reaktion, die als Xanthoproteïnreaktion bekannt ist und die die Anwesenheit aromatischer Kerne erkennen läßt.

Weniger eindeutig sind die Resultate bei der Halogenierung der Proteïne. Versuche von Blum und Hofmeister [5]) zeigen z. B. im Falle der Jodierung, daß man je nach den Versuchsbedingungen zu verschieden jodierten Produkten gelangt, wobei sich die Menge des substituierenden Jods nur schwer bestimmen läßt, weil man zwischen locker und fest gebundenem, sowie perjodidartig gebundenem Jod zu unterscheiden hat.

Methyliert werden die Eiweißstoffe am besten durch erschöpfende Methylierung mit Dimethylsulfat; es gelingt auch durch Behandeln mit Diazomethan. Nach Edlbacher [6]) gibt diese Methode der Methylierung einen ungefähren Aufschluß über Zahl und Art der Bindungsweise der ins Molekül eingeführten Methylgruppen und damit auch einen Rückschluß auf die im Molekül vorhandenen methylierbaren Gruppen.

Die Acetylierung von Eiweißstoffen wurde von Landsteiner und Prasek [7]) durchgeführt. Die eingeführten Acetylgruppen lassen sich abspalten und quantitativ bestimmen. Man erhält dadurch einen Überblick über die Zahl der acetylierbaren Gruppen im Eiweißmolekül.

Die Benzoylierung hat bereits E. Fischer nach der Schotten-Baumannschen Methode auf das Gebiet der Aminosäuren übertragen, wobei er anstelle von Alkalihydroxyd Alkalikarbonat verwendet. Blum und Umbach [8]) haben dann diese Methode auf Eiweißstoffe angewendet, und Goldschmidt [9]) konnte hierbei zeigen, daß man bei den Benzoylderivaten zwei verschiedene Benzoylbindungen zu unterscheiden hat, je nachdem das Benzoyl am Sauerstoff einer Hydroxyl- oder am

[3]) Habil. Schrift, Straßburg (1893).
[4]) Z. physiol. Ch. **72**, 486(11).
[5]) Z. physiol. Ch. **24**, 462(1898).
[6]) Z. physiol. Ch. **107**, 52(19); **108**, 287(19/20); **110**, 153(20); **112**, 80(20/21).
[7]) Biochem. Z. **74**, 388(16).
[8]) Z. physiol. Ch. **88**, 285(13).
[9]) Z. physiol. Ch. **165**, 285(27).

Stickstoff einer α-Aminogruppe haftet. Bei den beiden Bindungen ist die Haftfestigkeit verschieden: die am Sauerstoff gebundenen Benzoylreste lassen sich schon durch kaltes Alkali leicht abspalten, während die am Stickstoff gebundenen erst nach sehr langer Zeit durch kaltes Alkali angegriffen werden. Nach Abspaltung der Benzoylgruppen läßt sich durch Titration der entstandenen Benzoesäure die Benzoylzahl, das ist die Zahl der eingetretenen Benzoylgruppen, quantitativ ermitteln.

Cl. Rimington [10]) hat Versuche zur Phosphorylierung der Proteïne gemacht. Die Eiweißstoffe werden mit Natronlauge und mit in Tetrachlorkohlenstoff gelöstem Phosphoroxychlorid nach Art der Schotten-Baumannschen Reaktion umgesetzt. Das Verhältnis Phosphor zu Stickstoff läßt sich quantitativ bestimmen, man kann also die Zahl der der Phosphorylierung zugänglichen Gruppen ermitteln.

Diese Phosphorylierung steht am nächsten der neuerdings von P. Baumgarten [11]) angewandten Sulfonierungsmethode. Nach dieser lassen sich Aminosäuren und Polypeptide unter sehr milden Bedingungen in gekühlter, wässriger, schwach alkalischer Lösung sulfonieren. Die Methode soll nun auf Eiweißstoffe übertragen werden, um in ihnen die der Sulfonierung zugänglichen Gruppen festzulegen. Zu diesem Zwecke wurden zunächst die freien im Eiweiß hauptsächlich vorkommenden Aminosäuren einer Sulfonierung unterworfen [12]). Als wichtigstes Resultat hat sich dabei ein verschiedenes Verhalten der funktionellen Gruppen der Aminosäuren ergeben.

In allen Fällen tritt die Sulfonsäuregruppe an den Stickstoff der Aminogruppe. Als Vertreter der Monoaminosäuren wurden Glykokoll, Alanin und Leucin sulfoniert. Es entstehen dabei die Kaliumsalze der entsprechenden N-Aminosulfonsäuren:

$KSO_3 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOK$ [13]),
$CH_3 \cdot CH(NHSO_3K) \cdot COOK$,
$(CH_3)_2 \cdot CH \cdot CH_2 \cdot CH(NHSO_3K) \cdot COOK$.

Ebenso verhalten sich die Monoaminodicarbonsäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure und bilden die Kaliumsalze:

$KOOC \cdot CH_2 \cdot CH(NHSO_3K) \cdot COOK$ und
$KOOC \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NHSO_3K) \cdot COOK$.

Aus Ornithin z. B. als Diaminomonocarbonsäure entsteht entsprechend den beiden vorhandenen Aminogruppen das Kaliumsalz einer N,N'-Diaminodisulfonsäure:

$KSO_3 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NHSO_3K) \cdot COOK$.

Beim Arginin liegen die Verhältnisse etwas anders. Dieses ist keine eigentliche Diaminosäure, weil die eine Aminogruppe einem Guanidinrest zugehört. Da diese hierin nicht sulfonierbar ist, so entsteht eine N-Argininmonosulfonsäure, und zwar wurde sie als Monokaliumsalz isoliert:

---

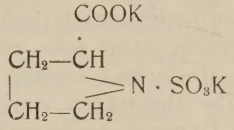
[10]) Biochem. Journ. **21**, 272(27).
[11]) Z. physiol. Ch. **171**, 62(27).
[12]) Dissertation Ilse Marggraff, 1. Chem. Inst. d. Univ. Berlin. (30).
[13]) P. Baumgarten, Z. physiol. Ch. **171**, 63(27).

$$NH{=}C{-}NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NHSO_3K) \cdot COOK.$$
$$\dot{N}H_2$$

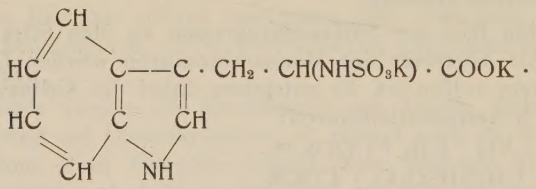
Das Cystin, ein Vertreter der Diaminodicarbonsäuren, verhält sich wie eine Diaminomonocarbonsäure und gibt das Kaliumsalz einer N,N'-Diaminodisulfonsäure:

$$KOOC \cdot CH(NHSO_3K) \cdot CH_2 \cdot S$$
$$KOOC \cdot CH(NHSO_3K) \cdot CH_2 \cdot \dot{S}$$

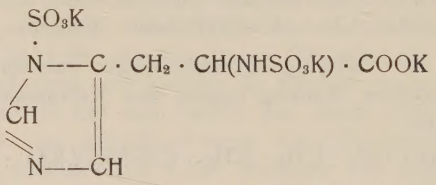
Die drei Aminosäuren Prolin, Tryptophan und Histidin enthalten einen heterocyklischen Ring und in ihm eine Iminogruppe. Das Prolin, die α-Pyrrolidincarbonsäure, das keine freie Aminogruppe, sondern nur die cyklische Iminogruppe enthält, wird in dieser Iminogruppe sulfoniert. Es entsteht das Kaliumsalz der N-Prolinsulfonsäure:



Dagegen läßt sich die Iminogruppe im Indolring des Tryptophans nicht sulfonieren. Die Sulfonsäuregruppe tritt hier natürlich auch an den Stickstoff der vorhandenen α-Aminogruppe. Es bildet sich das Kaliumsalz einer N-Tryptophanmonosulfonsäure:



Bei der Sulfonierung des Histidins, der β-Imidazyl-α-Aminopropionsäure, tritt eine Sulfonsäuregruppe an die α-Aminogruppe und eine zweite an den Stickstoff der Iminogruppe des Imidazolringes. Es entsteht also das Kaliumsalz einer N,N'-Histidindisulfonsäure:



Serin, Tyrosin und Oxyprolin enthalten je außer der Aminogruppe noch eine weitere funktionelle Gruppe, nämlich die Hydroxylgruppe. Während sich das aliphatisch gebundene Hydroxyl im Serin nicht sulfonieren läßt, gelingt es, die Sulfonsäuregruppe in das aromatisch gebundene Hydroxyl des Tyrosins einzuführen: Tyrosin bildet das Kaliumsalz einer O,N-Tyrosindisulfonsäure:

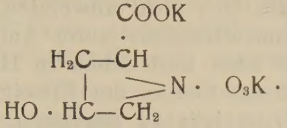
$$KSO_3 \cdot O \cdot C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot CH(NHSO_3K) \cdot COOK$$ [14]),

[14]) P. Baumgarten, Z. physiol. Ch. 171, 63(27).

Serin, das einer N-Serinmonosulfonsäure:

$$CH_2OH \cdot CH(NHSO_3K) \cdot COOK.$$

Dieses Verhalten steht übrigens in Übereinstimmung mit den Resultaten, die man bei der Benzoylierung von Serin und Tyrosin erhält. Nach Abderhalden und Brockmann[15]) gibt Tyrosin bei der Benzoylierung eine O,N-Dibenzoylverbindung, während das Serin eine N-Monobenzoylverbindung liefert. Die Hydroxylgruppe im Oxyprolin verhält sich wie die aliphatisch gebundene im Serin, sie ist also nicht sulfonierbar: bei der Sulfonierung entsteht eine Oxyprolin-N-monosulfonsäure:



Nach den bisherigen Forschungsergebnissen hat, wie schon eingangs erwähnt, ein polypeptidartiger Aufbau des Eiweißmoleküls die größte Wahrscheinlichkeit. In Hinblick auf die Übertragung der Sulfonierungsmethode auf das Gebiet der Eiweißstoffe erschien es daher zweckmäßig, vor der Untersuchung der Sulfonierungsprodukte der Proteïne die Sulfonierung der Polypeptide zu studieren. Es war festzustellen, ob die bei den Aminosäuren gewonnenen Ergebnisse auch ohne weiteres Gültigkeit für die Polypeptide besitzen, ob nicht etwa durch die polypeptidartige Verknüpfung die funktionellen Gruppen der einzelnen Aminosäuren in ihrem Verhalten hinsichtlich der Sulfonierung eine Veränderung aufweisen. Dies ist eine der Aufgaben vorliegender Arbeit. Wie bereits ausgeführt wurde, wird auch von einigen Forschern die Möglichkeit des Vorkommens von Dioxopiperazinen im Eiweißmolekül diskutiert. Mit Rücksicht darauf wurde auch das Verhalten von Dioxopiperazinen in bezug auf die Sulfonierung untersucht.

Die Sulfonierung von Polypeptiden und Diketopiperazinen wurde ebenso wie die bereits erwähnte Sulfonierung der freien Aminosäuren mit Hilfe der N-Pyridiniumsulfonsäure durchgeführt. Diese Verbindung hat die Formel:

$$C_5H_5\overset{+}{N} \cdot SO_2 \cdot \overset{-}{O}$$

Sie entsteht aus Pyridin und Schwefeltrioxyd bezw. solchen Stoffen, welche Schwefeltrioxyd abzuspalten vermögen, wie Chlorsulfonsäure, deren Estern oder Sulfurylchlorid beim Nachbehandeln mit Wasser[16]). Die N-Pyridiniumsulfonsäure überträgt Schwefeltrioxyd leicht auf alle Stoffe, die einer Sulfonierung zugänglich sind[17]), daher auch auf Aminosäuren, Polypeptide und Diketopiperazine. Im Falle der Polypeptide ist ebenso wie bei den Aminosäuren ihr amphoterer Charakter zu berücksichtigen. Auch die Aminogruppe der Polypeptide ist nicht frei. Sie

---

[15]) Biochem. Z. **225** (30).
[16]) P. Baumgarten, B. **59**, 1166(26); B. **60**, 1174(27).
[17]) P. Baumgarten, B. **59**, 1976(26).

steht mit der Carboxylgruppe in salzartiger Bindung, wie das die Betaïnformeln:

$$\overset{+}{H_3N} \cdot CH(R) \cdot CONH \cdot CH(R) \cdot \overset{-}{COO} \quad \text{bezw.}$$

$$\overset{+}{H_3N} \cdot CH(R) \cdot CONH \cdot CH(R) \cdot \overset{-}{COO}$$

ausdrücken. Zwecks Sulfonierung muß aber die Aminogruppe freigelegt werden. Man hat daher die Carboxylgruppe durch anderweitige Salzbildung abzusättigen. Das geschieht am zweckmäßigsten, indem man in alkalischer Lösung unter Verwendung von Alkalicarbonat arbeitet. Alkalihydroxyd läßt sich nicht anwenden, da es schon in der Kälte mit der N-Pyridiniumsulfonsäure unter Aufspaltung des Pyridinringes reagiert. Es wurde aber auch schon in Hinblick auf die Übertragung der Methode auf das Gebiet der Eiweißstoffe vermieden, um dort der Gefahr einer Hydrolyse zu begegnen. Man wählte Kaliumcarbonat, weil man in diesem Falle die Sulfonierungsprodukte aus einer mit Essigsäure angesäuerten Lösung durch absoluten Alkohol ausfällen kann, während das überschüssige Kaliumcarbonat als alkohollösliches Kaliumacetat in Lösung bleibt. Die Sulfonierungsreaktion geht im Sinne der Gleichung:

$$RCH(NH_2) \cdot CONH - CHR \cdot COOK + \overset{+}{C_5H_5N}\overset{-}{SO_2O} + K_2CO_3 =$$
$$RCH \cdot NH(SO_3K) \cdot CONH \cdot CHR \cdot COOK + C_5H_5N + KHCO_3$$

vor sich.

Die Arbeitsweise ist derart, daß man das Polypeptid in einer wässrigen Lösung von Kaliumcarbonat löst, zu der gekühlten Lösung die N-Pyridiniumsulfonsäure in geringem Überschuß zugibt und nun solange schüttelt, bis die Pyridiniumsulfonsäure zum größten Teil verbraucht ist. Es wird in einem Gefäß besonderer Konstruktion (nach Art der Fischerschen Trockenpistole) auf der Maschine geschüttelt. Dies Verfahren gestattet eine Kühlung der Reaktionsflüssigkeit während des Schüttelns. Die N-Pyridiniumsulfonsäure und das Kaliumcarbonat werden in äquimolekularen Mengen hinzugegeben. Der Endpunkt der Reaktion läßt sich leicht erkennen: anstelle der N-Pyridiniumsulfonsäure scheidet sich Kaliumsulfat aus, welches im Aussehen von ersterer leicht zu unterscheiden ist. Neben der eigentlichen Sulfonierungsreaktion findet nämlich noch eine Zersetzung der N-Pyridiniumsulfonsäure statt, die nach der Gleichung:

$$\overset{+}{C_5H_5N}\overset{-}{SO_2O} + K_2CO_3 = C_5H_5N + K_2SO_4 + CO_2$$

zu Kaliumsulfat, Pyridin und Kohlensäure als Reaktionsprodukten führt. Die Temperatur der Reaktionsflüssigkeit liegt am günstigsten um 10°. Bei tieferer Temperatur erfolgt eine zu langsame Sulfonierung. Es scheint, als ob dann die eben erwähnte Zersetzung der N-Pyridiniumsulfonsäure zu Sulfat und Pyridin schneller verläuft als die Sulfonierung, so daß natürlich eine schlechtere Ausbeute an sulfoniertem Produkt erhalten wird. Die N-Pyridiniumsulfonsäure ist im allgemeinen nach $1^1/_2$-stündigem Schütteln aufgebraucht. Jedoch ist dann noch keine quantitative Sulfonierung erfolgt, wie die Aufarbeitung zeigt. Dies gilt

nicht nur für die freien Aminosäuren, sondern auch für Peptide[18]). Auch bei einem vielfachen Überschuß an N-Pyridiniumsulfonsäure kommt es zu keiner quantitativen Sulfonierung. Das bei der Reaktion entstandene Pyridin scheint die Sulfonierungsreaktion zugunsten der Zersetzung der N-Pyridiniumsulfonsäure zu Pyridin und Sulfat zu beeinflussen. Um daher die Sulfonierung quantitativ durchzuführen, muß man vor Zugabe von neuem Sulfonierungsmittel erst das störende Pyridin ausäthern. Vorher wird noch von dem während der Reaktion gebildeten Kaliumsulfat abgesaugt. Die ausgeätherte Lösung wird nun ein zweites Mal mit Kaliumcarbonat und N--Pyridiniumsulfonsäure versetzt und erneut $1^1/_2$ Stunden geschüttelt. Für den zweiten Sulfonierungsansatz werden ungefähr $^2/_3$ der ursprünglichen Menge der N-Pyridiniumsulfonsäure und des Kaliumcarbonates verwendet.

Zur Isolierung der sulfonierten Verbindung wird das entstandene Kaliumsulfat abgesaugt und die Lösung mit Essigsäure neutralisiert. Dabei wird das überschüssige Kaliumcarbonat in alkohollösliches Kaliumacetat umgewandelt. Nun wird mit wenig Alkohol versetzt, um den Rest des Kaliumsulfates zu fällen. Nachdem von diesem abgesaugt ist, wird mit viel Alkohol das Sulfonierungsprodukt, das Kaliumsalz des sulfonierten Peptides, gefällt. Durch Lösen in Wasser oder in verdünntem 30prozentigem Alkohol und Ausfällen mit absolutem Alkohol erhält man analysenreine Präparate.

Bei der Sulfonierung der Polypeptide war zunächst festzustellen, ob außer der freien Aminogruppe auch die die Polypeptide speziell charakterisierende Säureamidbindung, d. h. die daran beteiligte Imidgruppe, einer Sulfonierung zugänglich ist. Dies ist nicht der Fall. Alle in vorliegender Arbeit untersuchten Polypeptide zeigen auch nicht ein einziges Mal den Ersatz des Imidwasserstoffes durch die Sulfonsäuregruppe. Sonst aber verhalten sich die funktionellen Gruppen der Aminosäuren in Polypeptiden ganz genau so, als ob die Aminosäuren frei vorlägen. Dies wurde an einigen charakteristischen Fällen nachgewiesen.

Zunächst wurden nur solche Polypeptide untersucht, die sich aus den einfachsten Monoaminocarbonsäuren aufbauen, wie Glycyl-glycin, Diglycyl-glycin und Leucyl-glycin. Sie ergeben nur N-Monosulfonsäuren. Es entstehen die Kaliumsalze:

$$KSO_3 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CONH \cdot CH_2 \cdot COOK,$$

das Kaliumsalz der N-Glycyl-glycinmonosulfonsäure,

$$KSO_3 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CONH \cdot CH_2 \cdot CONH \cdot CH_2 \cdot COOK,$$

das Kaliumsalz der N-Diglycyl-glycinmonosulfonsäure, und

$$(CH_3)_2 \cdot CH \cdot CH_2 \cdot CH(NHSO_3K) \cdot CONH \cdot CH_2 \cdot COOK,$$

das Kaliumsalz der N-Leucyl-glycinmonosulfonsäure.
Aus diesen Ergebnissen darf man schließen, daß auch die höheren aus einfachen Monoaminocarbonsäuren aufgebauten Polypeptide nur in der Aminogruppe sulfonierbar sind.

---

[18]) P. Baumgarten, Z. physiol. Ch. 171, 66(27).

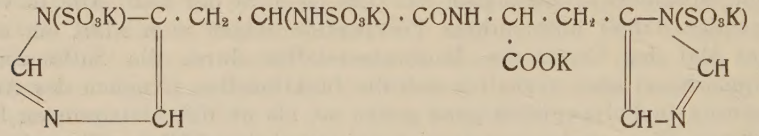
Als Vertreter solcher Polypeptide, die außer der Aminogruppe noch eine andere funktionelle Gruppe enthalten, wurden Glycyl-serin und Glycyl-tyrosin auf ihr Verhalten gegen N-Pyridiniumsulfonsäure untersucht, und zwar mit Rücksicht darauf, daß sich die Hydroxylgruppe im freien Serin und Tyrosin verschieden verhält. Auch bei den Peptiden hat sich gezeigt, daß nur das aromatisch gebundene Hydroxyl des Glycyl-tyrosins — neben der Aminogruppe selbstverständlich — sufonierbar ist, während es nicht gelingt, die Sulfonsäuregruppe in das aliphatisch gebundene Hydroxyl des Glycyl-serins einzuführen. Dementsprechend erhält man bei der Sulfonierung das Trikaliumsalz einer O,N-Glycyl-tyrosindisulfonsäure:

$$(SO_3K)NH \cdot CH_2 \cdot CONH \cdot CH \begin{matrix} \cdot COOK \\ \cdot CH_2 \cdot C_6H_4 \cdot OSO_3K. \end{matrix}$$

und das Dikaliumsalz einer N-Glycyl-serinmonosulfonsäure:

$$(SO_3K)NH \cdot CH_2 \cdot CONH \cdot CH \cdot (CH_2OH) \cdot COOK.$$

Als besonders charakteristisch erscheinendes Beispiel wurde schließlich noch das Histidyl-histidin der Sulfonierung unterworfen. Im Falle des unverketteten Histidins erwies sich die Iminogruppe des Imidazolringes als sulfonierbar. Wie der Versuch zeigt, wird auch das Histidin in polypeptidartiger Bindung, wie diese im Histidyl-histidin gewissermaßen doppelt in Bezug auf einen Histidinrest vorliegt, in seinem Verhalten gegen N-Pyridiniumsulfonsäure nicht verändert. Man erhält also das Trikaliumsalz einer N, N', N''-Histidyl-histidintrisulfonsäure von der Konstitution:



Die eben besprochenen Kaliumsalze der Peptidsulfonsäuren verhalten sich ganz entsprechend wie die Kaliumsalze der Aminocarbonsulfonsäuren. Sie sind in Wasser sehr leicht löslich, unlöslich in Alkohol, Äther und den anderen üblichen organischen Lösungsmitteln. Sie zerfließen sofort oder nach ganz kurzem Stehen an der Luft. Wegen ihrer Löslichkeitsverhältnisse lassen sie sich nicht umkristallisieren. Man reinigt sie am zweckmäßigsten durch Lösen in wenig Wasser oder verdünntem Alkohol und Wiederausfällen mit absolutem Alkohol und erhält sie dadurch analysenrein. Alle bisher untersuchten Kaliumsalze kristallisieren mit Wasser oder Alkohol.

Ihre wässrigen Lösungen sind beständig, solange sie neutral sind. Auch in schwach alkalischer Lösung sind sie verhältnismäßig beständig. In saurer Lösung tritt in der Kälte sehr langsam, etwas schneller beim Erhitzen, Hydrolyse unter Abspaltung der Sulfonsäuregruppe als Schwefelsäure und Rückbildung des Peptides ein:

$$RCH(NHSO_3K) \cdot CONH \cdot CHR \cdot COOK + H_2O = RCH(NH_2) \cdot CONH \cdot CHR \cdot COOH + K_2SO_4.$$

Sehr beschleunigt wird die Abspaltung von Schwefelsäure bei Gegenwart von salpetriger Säure. Die Abspaltung von Schwefelsäure in salzsaurer Lösung, am besten in Gegenwart von Ammoniumnitrit, wird auch bei der Ermittlung der Anzahl der in das Peptidmolekül eingetretenen Sulfonsäuregruppen verwendet. Die Schwefelsäure wird gravimetrisch als Bariumsulfat bestimmt.

In alkalischer Lösung besteht zwar nicht die Gefahr einer Hydrolyse im Sinne einer Abspaltung der Sulfonsäuregruppe unter Bildung von Schwefelsäure, sondern es erfolgt eine Hydrolyse unter Bildung von Aminocarbon-N-Sulfonsäuren und Aminocarbonsäuren gemäß der Gleichung:

$$RCH(NHSO_3K) \cdot CONH \cdot CHR \cdot COOK + H_2O = RCH(NHSO_3K) \cdot COOK + NH_2 \cdot CHR \cdot COOH,$$

ganz analog der Spaltung unsulfonierter Peptide in Aminosäuren. Die dabei auftretenden Verhältnisse werden weiter unten ausführlich besprochen werden.

Die bisher erörterten Untersuchungsergebnisse zeigen Übereinstimmung mit den bei der Sulfonierung von Aminosäuren gewonnenen. Aus alledem ist der Schluß gerechtfertigt, daß die hier in Rede stehende Sulfonierungsmethode auch auf das Gebiet der Eiweißstoffe übertragen werden kann, d. h. daß die sich einer Sulfonierung als zugänglich erwiesenen funktionellen Gruppen ein gleiches Verhalten auch im Eiweißmolekül zeigen werden. Durch Untersuchung der Sulfonierungsprodukte von Eiweißstoffen könnte man also zur Klarheit über die Art und Verkettung der funktionellen Gruppen im Eiweißmolekül gelangen. Besonders günstig ist, daß bei alkalischer Hydrolyse, wie in dieser Arbeit am Verhalten der sulfonierten Peptide klargelegt werden konnte, die Sulfonsäuren nicht abgespalten werden. Man kann durch den Zuwachs der dabei neu entstandenen funktionellen Gruppen, welche erneut sulfonierbar sind, einen Anhaltspunkt für die Art der Bindungsstellen erhalten. Da die Sulfonsäuregruppen in saurer Lösung leicht als Schwefelsäure abspaltbar sind, lassen sie sich gut quantitativ bestimmen. Nach der Methode von van Slyke[19]) läßt sich die Anzahl der freien Aminogruppen ermitteln. Aus dem Verhältnis der Zahl der freien Aminogruppen im unsulfonierten Eiweiß und der in das Molekül eintretenden Sulfonsäuregruppen, evtl. auch unter Berücksichtigung der K-Atome der Säurereste, kann man feststellen, ob außer den freien Aminogruppen noch andere sulfonierbare Reste im Eiweißmolekül vorhanden sind.

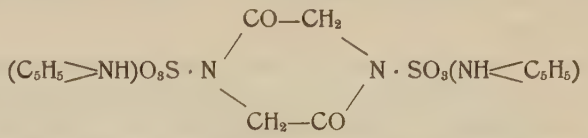
Wie bereits angedeutet wurde, sollen auch möglicherweise Diketopiperazine am Aufbau des Proteïnmoleküls beteiligt sein, und deshalb wurde auch das Verhalten dieser Verbindungen gegen N-Pyridiniumsulfonsäure näher untersucht. Aus dem Verhalten der Polypeptide konnte schon mit sehr großer Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, daß auch die Acylamidbindung in den Diketopiperazinen, wo sie zweifach auftritt, nicht sulfonierbar sein wird. Und tatsächlich sind die

[19]) Journ. biol. Ch. 9, 185(11).

Diketopiperazine, wie am Beispiel des Diketopiperazins und des Leucyl-glycinanhydrides gezeigt wurde, unter den bei den Aminosäuren und Polypeptiden angewandten Bedingungen nicht sulfonierbar.

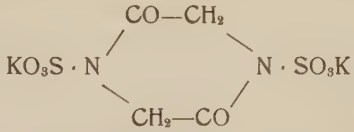
Unter anderen Bedingungen, bei energischerer Einwirkung der N-Pyridiniumsulfonsäure (bei höherer Temperatur ohne Gegenwart eines Verdünnungsmittels) sind aber auch Diketopiperazine einer Sulfonierung zugänglich.

Zu diesem Zwecke schmilzt man z. B. Glycinanhydrid mit 2,1 Mol N-Pyridiniumsulfonsäure, innig vermischt, im Metallbad bei 150°—155° und erhält nach dem Abkühlen sofort in quantitativer Ausbeute das gut kristallisierende Pyridiniumsalz einer Diketopiperazindisulfonsäure. Ihre beiden Sulfonsäuregruppen müssen, wie die weiter unten behandelten Aufspaltungsversuche, besonders in alkalischer Lösung, beweisen, am Stickstoff sitzen; sie muß also eine N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure sein, das Pyridiniumsalz hat also folgende Formel:

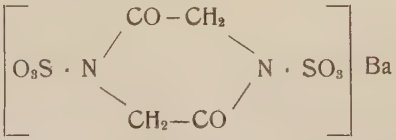


Zur Reinigung wird das Pyridiniumsalz in Wasser unter geringem Erwärmen gelöst und nach dem Filtrieren mit absolutem Alkohol ausgefällt. Es scheidet sich in weißen Kristallnädelchen ab, ist nicht hygroskopisch und weitaus weniger rasch löslich in Wasser als die Salze der Peptidsulfonsäuren.

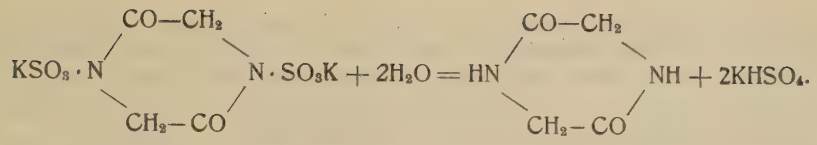
Auch sonst verhält sich die Diketopiperazindisulfonsäure abweichend von den bisher besprochenen Peptidsulfonsäuren. Besonders charakteristisch ist, wie schon das Pyridiniumsalz erkennen läßt, die Bildung von relativ schwerlöslichen Salzen, wie z. B. dem Kalium- und dem Bariumsalz. Das Kaliumsalz



erhält man in quantitativer Ausbeute durch Umsetzen des Pyridiniumsalzes mit alkoholischer Kalilauge oder mit wässriger Kaliumbicarbonatlösung. Aus Wasser kristallisiert es in weißen Kristallnadeln. Versetzt man seine wässrige Lösung mit heißer Bariumchloridlösung, so fällt das noch schwerer lösliche Bariumsalz:



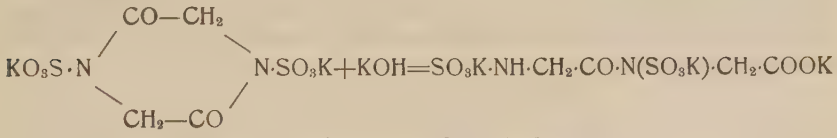
Die Salze des disulfonierten Diketopiperazins sind in neutraler Lösung verhältnismäßig beständig, dagegen recht unbeständig in saurer Lösung. Hierin erfolgt eine in der Hitze fast momentan vor sich gehende quantitative Aufspaltung in Diketopiperazin und Schwefelsäure:



Deswegen ließ sich auch die freie Diketopiperazindisulfonsäure nicht isolieren.

Dieses Verhalten, verschieden von dem der Peptidsulfonsäuren, die auch in heißer saurer Lösung verhältnismäßig langsam hydrolysiert werden, ist charakteristisch für die N-Sulfonsäuren von Säureamiden, wie die kürzlich ausgeführten Untersuchungen an N-Acylsulfamidsäuren zeigen[20]). Auch hier erfolgt beim Ansäuren der wässrigen Salzlösungen, langsam in der Kälte, augenblicklich in der Hitze, Hydrolyse unter quantitativer Abspaltung des Sulfonsäurerestes als Schwefelsäure und Zurückbleiben von Säureamid. Diese sofortige quantitative Abspaltung der Sulfonsäurereste aus dem sulfonierten Diketopiperazin in saurer Lösung ist, die Konstitution als gegeben vorausgesetzt, ein Beweis dafür, daß die Hydrolyse wirklich in dem durch die Gleichung wiedergegebenen Sinne vor sich geht; denn fände nebenher noch eine Aufspaltung des Diketopiperazinringes zu Peptid- oder Amino-N-Sulfonsäure statt, so würde aus den nunmehr gebildeten Aminosulfonsäuren die Abspaltung der Sulfonsäurereste erst nach Zugabe von Ammoniumnitrit (siehe S. 11) rasch verlaufen.

In alkalischer Lösung werden die Sulfonsäuregruppen nicht abgespalten, wohl aber tritt ganz entsprechend wie beim unsulfonierten Diketopiperazin hydrolytische Spaltung der Säureamidbindung ein, und es bildet sich zunächst (beim Behandeln mit 1 Mol Kalilauge) nach der Gleichung:



das Kaliumsalz eines disulfonierten Glycyl-glycins:

$$SO_3K \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot N(SO_3K) \cdot CH_2 \cdot COOK,$$

d. h. eines Glycyl-glycins, das sowohl in der bei der Hydrolyse gebildeten Aminogruppe als auch in der verbleibenden Imidogruppe sulfoniert ist.

Man ist also auf diese Weise zu einer Verbindung gekommen, die man durch direkte Sulfonierung des Glycyl-glycins, bei der ja nur eine monosulfonierte Verbindung entsteht, nicht erhält. Das Kaliumsalz der Glycyl-glycindisulfonsäure ist, ähnlich wie die Salze der andern Peptidsulfonsäuren, ein weißes kristallines, sehr hygroskopisches Pulver von gleichen Löslichkeitsverhältnissen. Abweichend ist das Verhalten der neuen Verbindung in saurer Lösung. Da ja bei ihr auch in die Säureamidgruppe ein Sulfonsäurerest eingeführt ist, der, wie aus dem Ver-

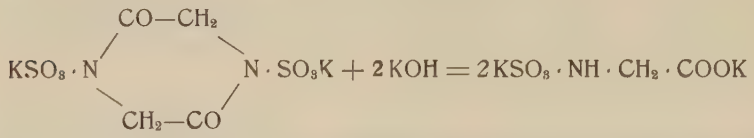
[20]) P. Baumgarten u. I. Marggraff, B.64, 1582(31).

halten am Stickstoff sulfonierter Säureamide bekannt, in heißer saurer Lösung sofort als Schwefelsäure abgespalten wird, so spaltet sich auch aus dem disulfonierten Glycyl-glycin beim Kochen in saurer Lösung die eine Sulfonsäuregruppe sofort ab, während die an der Aminogruppe haftende erst nach längerem Kochen, momentan aber nur bei Zugabe von Ammoniumnitrit, abgespalten wird.

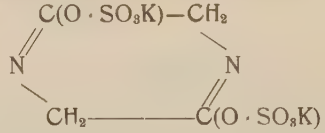
In alkalischer Lösung spaltet die Glycyl-glycindisulfonsäure wie auch die Diketopiperazindisulfonsäure keine Sulfonsäuregruppen ab, sondern sie erleidet einen weitergehenden hydrolytischen Abbau, der an der Säureamidbindung stattfinden muß, da die N-Glycin-sulfonsäure als Aufspaltungsprodukt isoliert werden kann. Die Hydrolyse muß also im Sinne der Gleichung:

$KSO_3 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot N(SO_3K) \cdot CH_2 \cdot COOK + KOH = 2\ SO_3K \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOK$ vor sich gegangen sein.

Diese Reaktion kann als zweite Stufe der alkalischen Aufspaltung der Diketopiperazindisulfonsäure angesehen werden. Man kann natürlich auch die beiden Stufen in einer Reaktion verlaufen lassen, also die Diketopiperazindisulfonsäure durch Einwirkung von 2 Mol Lauge direkt zu 2 Mol N-Glycinsulfonsäure abbauen:



Aus dem Ergebnis der alkalischen Hydrolyse ergibt sich nun ohne weiteres die Richtigkeit für die angenommene Konstitution sowohl der Diketopiperazindisulfonsäure als auch der Glycyl-glycindisulfonsäure als N,N'-Disulfonsäure; denn läge am Sauerstoff sulfoniertes Diketopiperazin vor, d. h. hätte das Diketopiperazin in seiner Enolform bei der Sulfonierung reagiert:



so wäre das Auftreten von N-Glycinsulfonsäure als Endprodukt der hydrolytischen Aufspaltung nur sehr gezwungen zu erklären.

Die in Hinsicht auf die Spaltbarkeit des disulfonierten Glycyl-glycins mit überschüssigem Alkali unternommenen Versuche waren nun auch noch in einer anderen Beziehung von besonderem Interesse. M. Bergmann [21]) hat festgestellt, daß beim diacetylierten Glycyl-glycinester — bei dem außer der Aminogruppe auch die Imidogruppe acetyliert ist — durch das Acetyl der Imidogruppe eine außerordentliche Schwächung der Peptidbindung zu beobachten ist. Schon durch $1^1/_2$-stündige Einwirkung von n/5 Lauge auf den Ester läßt sich nach Bergmann eine völlige Aufspaltung der Peptidbindung erzielen. Diese Beobach-

[21]) B. 62, 1909(29).

tungen waren deswegen besonders bedeutungsvoll, weil bei der Hydrolyse, besonders bei der enzymatischen, von Eiweiß und Peptid der Imidogruppe der Peptidbindung eine besondere Bedeutung zukommen soll[22,23]).

Man sollte nun annehmen können, daß die Sulfonsäuregruppe als sogenannter stark negativer Rest eine besonders große Belastung für das Molekül bedeuten müßte, wie ja auch z. B. die Belastung durch die Sulfonsäuregruppe bei der hydrolytischen Sprengung des Pyridinringes von besonderer Wirksamkeit ist[24]). Fußend auf die Versuche von Bergmann war nun in unserem Falle, im Falle des disulfonierten Glycyl-glycins, eine besonders beschleunigte Aufspaltung der Peptidbindung zu erwarten. Eine Beschleunigung der Hydrolyse infolge der Besetzung des Stickstoffs der Säureamidbindung mit der Sulfonsäuregruppe läßt sich aber nicht feststellen: disulfoniertes Glycyl-glycin wird durch Alkali mit ungefähr der gleichen Geschwindigkeit gespalten wie das — nur in der Aminogruppe — monosulfonierte Glycyl-glycin.

Dem Studium dieser Verhältnisse mußte naturgemäß das der alkalischen Hydrolyse der nur in der Aminogruppe sulfonierten Polypeptide vorausgehen. Es war hier zunächst zu untersuchen, ob durch die Sulfonierung überhaupt ein labilisierender Einfluß auf die Festigkeit der Peptidbindung ausgeübt wird. Dies ist in gewissem Grade der Fall. N-Glycyl-glycinmonosulfonsäure wird unter gleichen Bedingungen in alkalischer Lösung in einem viel größeren Grade aufgespalten als unsulfoniertes Glycyl-glycin. So werden unter unseren Versuchsbedingungen ungefähr 10% Glycyl-glycin zu Glycin aufgespalten, während dagegen das monosulfonierte Gycyl-glycin in dem gleichen Zeitraum zu 60% der Hydrolyse unterliegt. Der Einfluß der Sulfonsäuregruppe, der in diesem Falle also ziemlich groß ist, wird aber durch die Verlängerung der Peptidkette wieder aufgehoben. Dies erkennt man bereits am Diglycyl-glycin, wo unter Berücksichtigung der Versuchsfehler ein Unterschied in der Geschwindigkeit der hydrolytischen Spaltung der sulfonierten Verbindung nicht mehr zu beobachten ist: Diglycyl-glycin wird zu 14%, monosulfoniertes Diglycyl-glycin zu 14,2% aufgespalten. Auch durch die Entfernung der Aminosulfonsäuregruppe von der Peptidbindung wird die Einwirkung der Sulfonsäuregruppe auf die Beschleunigung der hydrolytischen Sprengung der Peptidbindung fast bis zum Verschwinden abgeschwächt, wie am Beispiel des Leucyl-glycins gezeigt werden konnte. Leucyl-glycin und N-Leucyl-glycinmonosulfonsäure werden bei der Behandlung mit Alkali zu ungefähr den gleichen Beträgen aufgespalten, und zwar Leucyl-glycin zu 8% und seine Monosulfonsäure zu 10%.

Die Methodik bei diesen hydrolytischen Aufspaltungsversuchen war folgende: Die Polypeptide und die Kaliumsalze der sulfonierten Polypeptide überließ man über einen gleichen Zeitraum der Einwirkung von 1 Mol n/8 Kalilauge. Bei den freien Polypeptiden wurde der bei der Hydrolyse auftretende Zuwachs an Carboxylgruppen durch Titration

[22]) Waldschmidt-Leitz, Z. f. angew. Ch., Jahrg. 43, Nr. 19, 377(30).
[23]) Balls und Köhler, B. **64**, 34 u. 294(31).
[24]) P. Baumgarten, B. **59**, 1166(26).

mit n/8 Kalilauge nach der Methode von R. Willstätter und Waldschmidt-Leitz[25]) in 97% alkoholischer Lösung mit Phenolphtaleïn als Indikator bestimmt. In den sulfonierten Polypeptiden ist durch die Sulfonsäuregruppe die Acidität der Carboxylgruppe so stark erhöht, daß ihre Kalisalze selbst in wässriger Lösung gegen Phenolphtaleïn neutral reagieren. Durch die Behandlung mit Kalilauge wird aus ihnen aber freie unsulfonierte Aminosäure gebildet, deren Betrag nun ebenfalls nach der Methode von R. Willstätter und Waldschmidt-Leitz titriert werden muß; hier natürlich durch Rücktitration des überschüssigen Alkalis mit n/10 Oxalsäure.

Experimenteller Teil.

Die N-Pyridiniumsulfonsäure, die für die folgenden Sulfonierungen zur Verwendung kam, wurde folgendermaßen nach der von P. Baumgarten[26]) angegebenen Methode dargestellt:

Ein Mol Pyridin wird in der ungefähr zehnfachen Menge absoluten Äthers gelöst. Dann werden tropfenweise unter Kühlung durch Eis-Kochsalzmischung und Umschütteln 0,85 Mol Chlorsulfonsäureäthylester zugegeben. Das entstandene Produkt wird abgesaugt, mit Äther und Eiswasser gut ausgewaschen und kurze Zeit auf Ton an der Luft getrocknet. Die Ausbeute beträgt 85% der Theorie, bezogen auf Pyridin.

Die so erhaltene N-Pyridiniumsulfonsäure enthält ungefähr 10% Wasser. Daher wurde sie für die Sulfonierung in wässriger Lösung in einem Überschuß von $^1/_{10}$ Mol verwendet.

1. Kaliumsalz der N-Glycyl-glycinmonosulfonsäure.

$KSO_3 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CONH \cdot CH_2 \cdot COOK + 1\ H_2O$.

Die Sulfonierung wird in einem doppelwandigen Gefäß, ähnlich der Fischerschen Trockenpistole, vorgenommen. Der innere Raum, der zur Aufnahme der Reaktionsflüssigkeit dient, endet in einem aufwärts gebogenen Hals, der durch einen Gummistopfen mit Glaskapillare verschlossen wird. Der äußere Mantel dient als Kühlmantel. Die Temperatur des Kühlwassers beträgt während der folgenden Versuche ungefähr 10°. Während des Verlaufes der Reaktion wird das Gefäß auf einer Schüttelmaschine geschüttelt.

Zur Darstellung des als Ausgangsmaterial dienenden Glycyl-glycins wurde die Fischersche Methode[27]) etwas abgeändert. 1g Diketopiperazin wird in 10 ccm n-Kalilauge bei gewöhnlicher Temperatur unter Schütteln aufgelöst. Die alkalische Lösung wird dann schwach essigsauer gemacht und mit absolutem Alkohol versetzt, wobei das Glycyl-glycin in reiner Form quantitativ ausfällt, da ja das bei der Neutralisation entstandene Kaliumacetat alkohollöslich ist. Aus 1 g Diketopiperazin

[25]) B. **54**, 2988(22).
[26]) B. **59**, 1166(26).
[27]) B. **38**, 607(05).

erhält man 1,1 g Glycyl-glycin, das über Schwefelsäure im Vakuumexsiccator getrocknet wird.

Man löst 2 g Glycyl-glycin und 2,5 g Kaliumcarbonat in 15 ccm Wasser. Die auf 10° abgekühlte Lösung wird mit 2,8 g N-Pyridiniumsulfonsäure versetzt und auf der Maschine bis zum fast völligen Verbrauch der N- Pyridiniumsulfonsäure geschüttelt. Dauer der Reaktion ungefähr $1^1/_2$ Stunden. Nun wird die von der nicht umgesetzten N-Pyridiniumsulfonsäure und dem gebildeten Kaliumsulfat abgesaugte Lösung ausgeäthert, um das bei der Reaktion entstandene Pyridin zu entfernen. Zu der ausgeätherten Lösung werden 2,1 g N-Pyridiniumsulfonsäure und 1,7 g Kaliumcarbonat zugegeben, worauf eine weitere Stunde unter denselben Bedingungen wie vorhin geschüttelt wird. Von der nicht ganz verbrauchten N-Pyridiniumsulfonsäure und dem neu entstandenen Kaliumsulfat wird abgesaugt. Das Filtrat wird mit Essigsäure gegen Lackmus schwach angesäuert und mit 20 ccm absolutem Alkohol versetzt, um die Hauptmenge des Kaliumsulfates abzuscheiden. Dieses wird abgesaugt, und nun wird aus dem Filtrat durch 100 ccm absoluten Alkohol das Sulfonierungsprodukt gefällt. Es setzt sich als farbloses Öl am Boden des Gefäßes ab, erstarrt aber bald beim Verreiben mit frischem absoluten Alkohol zu einem weißen, kristallinen Pulver. Dieses wird abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und noch ätherfeucht in einen Vakuum-Exsiccator über Phosphorpentoxyd gebracht. Die Ausbeute beträgt 2,8 g, das sind 60% der Theorie. Die Substanz ist noch ein wenig mit Kaliumsulfat verunreinigt. Um sie analysenrein zu erhalten, wird sie in der dreifachen Menge 30 vol.-proz. Alkohols gelöst und aus der Lösung nach dem Filtrieren mit absolutem Alkohol wieder gefällt.

Zur Analyse wird sie in der Fischerpistole über Phosphorpentoxyd bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Kohlenstoffbestimmung wurde auf flüssigem Wege nach der modifizierten Messingerschen Methode ausgeführt, da die Verbrennung im Chromatrohr keine eindeutigen Werte liefert. Der Schwefel wurde durch hydrolytische Abspaltung der Sulfonsäuregruppe mittels Ammoniumnitrit in salzsaurer Lösung und Fällung der gebildeten Schwefelsäure als Bariumsulfat bestimmt. Auch bei den folgenden Verbindungen wurden die Kohlenstoffbestimmung und die Schwefelbestimmung in derselben Weise ausgeführt.

0,1859 g Substanz gaben 0,1043 g K_2SO_4.
0,1608 g Substanz gaben 0,1216 g $BaSO_4$.
0,1752 g Substanz gaben13,70 ccm N(20°, 761 mm, korr.).
0,1558 g Substanz gaben 0,0892 g CO_2.

$C_4H_6O_6N_2S_1K_2 + 1\ H_2O$ (306,35).

Ber. K 25,52% S 10,47% N 9,14% C 15,67%
Gef. K 25,18% S 10,39% N 9,12% C 15,62%.

Die Substanz ist hygroskopisch und in Wasser sehr leicht löslich. Mit salzsaurer Bariumchloridlösung gibt sie beim Kochen allmählich eine Fällung von Bariumsulfat. Diese erfolgt sofort bei Zugabe von Ammoniumnitrit.

2. Kaliumsalz der N-Diglycyl-glycinmonosulfonsäure.

$(SO_3K)NH \cdot CH_2 \cdot CONH \cdot CH_2 \cdot CONH \cdot CH_2 \cdot COOK + 1\ H_2O.$

Als Ausgangsprodukt zur Gewinnung von Diglycyl-glycin[28]) eignet sich am besten Diketopiperazin. Dieses wird durch Lösen bei Zimmertemperatur in 2n-Natronlauge (1 Mol) zu Glycyl-glycin aufgespalten, und in dieser Lösung wird dann die Kuppelung mit 1,25 Mol Chloracetylchlorid vollzogen. Nach dem Ansäuren mit der äquivalenten Menge 5n-Salzsäure wird bei 35° eingeengt. Das so erhaltene Chloracetylglycyl-glycin wird aus heißem Wasser mit Tierkohle umkristallisiert und dann mit 25-proz. Ammoniak zum Diglycyl-glycin aminiert.

1 g Diglycyl-glycin wird mit 3,1 g Pottasche in 10 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit 3,7 g N-Pyridiniumsulfonsäure $1^1/_2$ Stunden wie bei der Sulfonierung des Glycyl-glycins auf der Maschine geschüttelt. Von dem entstandenen Kaliumsulfat und unverbrauchter N-Pyridiniumsulfonsäure wird abgesaugt und das Pyridin ausgeäthert. Die Lösung wird nach Zugabe von 2,2 g Pottasche und 2,5 g N-Pyridiniumsulfonsäure erneut $1^1/_2$ Stunden geschüttelt. Nachdem wieder von Kaliumsulfat und der übriggebliebenen N-Pyridiniumsulfonsäure abgesaugt ist, wird mit Essigsäure neutralisiert und mit 10 ccm absolutem Alkohol das Kaliumsulfat abgeschieden. Aus dem Filtrat wird mit 80 ccm absolutem Alkohol das ölige Sulfonierungsprodukt gefällt. Die überstehende alkoholische Lösung wird nun abgegossen und das Öl mehrere Male mit frischem absolutem Alkohol verrieben, wobei es zu einem weißen, kristallinischen Pulver erstarrt. Dieses wird abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und noch ätherfeucht in einen Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd gebracht. Ausbeute 1g, das sind 58% der theoretischen Ausbeute.

Die Substanz wurde über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, ehe sie zur Analyse gelangte, und zwar bei 56°, der Temperatur des siedenden Acetons. Bei 100° zu trocknen, war nicht möglich, da die Verbindung bei dieser Temperatur schmolz.

0,1326 g Substanz gaben 0,0640 g K_2SO_4.
0,1284 g Substanz gaben 0,0836 g $BaSO_4$.
0,0942 g Substanz gaben 9,30 ccm N(24°, 752, 1 mm, korr.).
0,1524 g Substanz gaben 0,1114 g CO_2.

$C_6H_9N_3S_1K_2 + 1H_2O$ (363,5).

Ber. K 21,52% S 8,82% N 11,56% C 19,81%
Gef. K 21,66% S 8,94% N 11,23% C 19,94%.

Die Substanz ist hygroskopisch und in Wasser sehr leicht löslich.

3. Kaliumsalz der N-Leucyl-glycinmonosulfonsäure.

$(CH_3)_2 \cdot CH \cdot CH_2 \cdot CH(NHSO_3K) \cdot CONH \cdot CH_2 \cdot COOK + 2\ H_2O.$

Zur Gewinnung von Leucyl-glycin wird Glykokoll nach der Methode von E. Fischer[29]) mit d,α-Bromisocapronylchlorid gekuppelt. Der Brom-

[28]) Abderhalden, Handbuch der biol. Arbeitsmethod. Abt. 1, 7, 846(23).
[29]) B. 39, 29 10/11 (06).

körper wird sechs Tage bei 25° in 25-proz. Ammoniak aufbewahrt, worauf auf Leucyl-glycin weiterverarbeitet wird.

1,7 g Leucyl-glycin, 2,7 g Kaliumcarbonat, 3,2 g N-Pyridiniumsulfonsäure gelangen in 15 ccm Wasser zur Umsetzung. Nach 1½-stündigem Schütteln wird abgesaugt, ausgeäthert und mit 2,2 g N-Pyridiniumsulfonsäure und 1,8 g Kaliumcarbonat eine weitere Stunde geschüttelt. Die filtrierte Reaktionsflüssigkeit wird mit Essigsäure neutralisiert und darauf mit 15 ccm absolutem Alkohol die Hauptmenge des Kaliumsulfates, das aber schon mit etwas Sulfonierungsprodukt vermengt ist, ausgefällt. Aus dem Filtrat scheidet man jetzt mit mehr Alkohol die Hauptmenge der sulfonierten Verbindung aus. Das sulfonierte Leucyl-glycin fällt auf Zugabe des Alkohols als gallertartiger, sehr voluminöser Niederschlag aus. Daher zeigt auch das zuerst abgeschiedene Kaliumsulfat schon gallertartiges Aussehen. Die Hauptmenge des Produktes ist noch stark mit Kaliumsulfat verunreinigt. Zur Reinigung wird es auf Ton an der Luft getrocknet. Man löst in Wasser und versetzt die wässrige Lösung mit Methylalkohol bis zur Trübung, worauf man eine Stunde stehen läßt. Allmählich scheidet sich reines Kaliumsulfat aus. Das Filtrat erweist sich aber immer noch als sulfathaltig; deshalb wird die Behandlung mit Methylalkohol wiederholt. Die schließlich von Kaliumsulfat befreite methylalkoholische Lösung wird im Vakuum eingeengt und mit absolutem Alkohol das jetzt reine sulfonierte Leucyl-glycin gefällt. Die Ausbeute beträgt nach dem Trocknen der Substanz im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd 1,3 g, das sind rund 40% der Theorie.

Zur Analyse wurde bei 100° über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,1212 g Substanz gaben 0,0566 g K_2SO_4.
0,1414 g Substanz gaben 0,0872 g $BaSO_4$.
0,0798 g Substanz gaben 5,55 ccm N(26°, 739,8 mm, korr.).
0,0504 g Substanz gaben 0,0455 g CO_2.

$C_8H_{14}O_6N_2S_1K_2 + 2H_2O$ (380,5).

Ber. K 20,55% S 8,43% N 7,36% C 25,23%
Gef. K 20,96% S 8,47% N 7,73% C 24,62%.

Die Substanz ist schwach hygroskopisch und in Wasser leicht löslich.

4. Kaliumsalz der N-Glycyl-serinmonosulfonsäure.

$CH_2(NHSO_3K) \cdot CONH \cdot CH \cdot (CH_2OH) \cdot COOK + \frac{1}{2} C_2H_5OH$.

Zur Gewinnung des Glycyl-serins wurde zunächst Serin nach der Methode von Leuchs und Geiger[30]) über den Aethoxyacetaldehyd dargestellt. Das dazu benötigte Monochloracetal wurde nach der Methode von Fritsch[31]) hergestellt. Nach Fischer und Roesner[32]) wurde dann über das Chloracetyl-serin Glycyl-serin gewonnen.

2 g Glycyl-serin werden in bekannter Weise in 15 ccm Wasser, in dem 6 g Pottasche gelöst sind, mit 6,6 g N-Pyridiniumsulfonsäure um-

[30]) B. **39**, 2644—2649(06).
[31]) A. **279**, 300 (1894).
[32]) A. **375**, 200

gesetzt. Nach $1^1/_2$-stündigem Schütteln auf der Maschine wird wie üblich vom Kaliumsulfat abgesaugt und das entstandene Pyridin ausgeäthert. Bei der zweiten Sulfonierung werden 4,5 g Pottasche und 5 g N-Pyridiniumsulfonsäure verwendet. Es wird eine Stunde geschüttelt, dann vom Kaliumsulfat und der nicht verbrauchten N-Pyridiniumsulfonsäure abgesaugt. Das Filtrat wird mit Essigsäure schwach angesäuert und mit 20ccm absolutem Alkohol die Hauptmenge des gelösten Kaliumsulfates abgeschieden. Mit 80 ccm absolutem Alkohol fällt nun aus dem Filtrat das Sulfonierungsprodukt als schwach gelblich gefärbtes Öl. Die überstehende alkoholische Lösung wird abgegossen und das Öl mit frischem absolutem Alkohol verrieben. Erst nach dreimaligem Wiederholen dieser Operation ist das Öl zu einem gelblichen, kristallinen Pulver zerfallen, das nach Waschen mit Alkohol und Äther wieder ätherfeucht in einen Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd zum Trocknen gebracht wird. Die Ausbeute beträgt 1,9 g, statt der zu erwartenden 4 g der theoretischen Ausbeute. Das sind also ungefähr 50%. Da eine Probe der Substanz noch mit Bariumchlorid eine geringe Fällung gab, also noch mit etwas Kaliumsulfat verunreinigt war, so wurde die Hauptmenge in 2 ccm Wasser gelöst und das Kaliumsulfat mit 2 ccm absolutem Alkohol abgeschieden. Aus dem Filtrat wurde mit 30 ccm absolutem Alkohol die nun analysenreine Verbindung gefällt.

Die Analysensubstanz wurde erst bei 56° über Phosphorpentoxyd vorgetrocknet und dann bei 100° bis zur Gewichtskonstanz gebracht.

0,1964 g Substanz gaben 0,0996 g K_2SO_4.
0,1169 g Substanz gaben 0,0751 g $BaSO_4$.
0,1223 g Substanz gaben 9,20 ccm N (18,5°, 746,5 mm korr.).
0,1091 g Substanz gaben 0,0862 g CO_2.

$C_5H_8O_7N_2S_1K_2 + \frac{1}{2}\ C_2H_5OH$ (341,35).

Ber. K 22,91% S 9,39% N 8,21% C 21,10%
Gef. K 22,76% S 8,82% N 8,65% C 21,55%.

Der Alkohol wurde qualitativ als Essigester nachgewiesen.

Die Substanz ist sehr hygroskopisch und in Wasser sehr leicht löslich.

5. Kaliumsalz der O,N-Glycyl-tyrosindisulfonsäure.

$$(SO_3K)NH \cdot CH_2 \cdot CONH \cdot CH \begin{matrix} \cdot\ COOK \\ \cdot\ CH_2 \cdot C_6H_4 \cdot OSO_3K \end{matrix} + 1\ C_2H_5OH.$$

Nach der Methode von E. Fischer [33]) wird Tyrosin mit Chloracetylchlorid gekuppelt und das so erhaltene Chloracetyl-tyrosin im geschlossenen Rohr mit 25-proz. Ammoniak eine Stunde auf 100° erhitzt. Die Flüssigkeit wird nun auf dem Wasserbade eingedampft und der sirupöse Rückstand mit absolutem Alkohol in der Kälte digeriert. Das erhaltene Produkt ist hygroskopisch und die Ausbeute an reinem Produkt nur minimal.

[33]) E. Fischer Ges. Werke, herausg. v. M. Bergmann, Unters. über Aminosrn., Polypept. und Proteine I (99/06), S. 346.

1,5 g Glycyl-tyrosin gelangen mit 3 g N-Pyridiniumsulfonsäure und 3,3 g Kaliumcarbonat in 10 ccm Wasser zur Umsetzung. Es wird $1^1/_2$ Stunden geschüttelt. Nachdem vom entstandenen Kaliumsulfat abgesaugt und das Pyridin ausgeäthert ist, werden zur zweiten Sulfonierung 2 g N-Pyridiniumsulfonsäure und 2,2 g Pottasche hinzugegeben. Es wird erneut $1^1/_2$ Stunden geschüttelt, dann vom Kaliumsulfat und der restlichen N-Pyridiniumsulfonsäure abgesaugt, das Filtrat mit Essigsäure neutralisiert und mit 15 ccm absolutem Alkohol versetzt. Man saugt ab und fällt aus dem Filtrat mit viel absolutem Alkohol das Sulfonierungsprodukt: ein weißes Pulver. Es wird mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknet. Rohausbeute ungefähr 2 g. Das Produkt ist noch ziemlich stark mit Kaliumsulfat verunreinigt. Auch nach dreimaligem Lösen in Wasser und fraktioniertem Ausfällen mit absolutem Alkohol läßt sich das Kaliumsulfat nur sehr schwer von der sulfonierten Verbindung trennen, da die Löslichkeitsverhältnisse beider Substanzen zu ähnlich sind. Mit dem zuerst durch wenig Alkohol ausgeschiedenen Kaliumsulfat zusammen fällt immer schon etwas Sulfonierungsprodukt aus. Dieses ist aber etwas löslicher in Alkohol als Kaliumsulfat, und man erhält daher durch Eindampfen der vereinigten alkoholischen Filtrate im Vakuum ungefähr 150 mg ganz reines Präparat, das zur Analyse verwendet wurde.

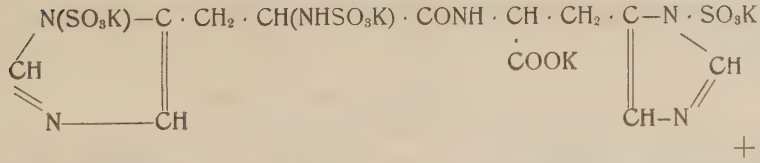
Die Analysensubstanz wurde bei 56° über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,0503 g Substanz gaben 0,0510 g CO_2
3,321 mg Substanz gaben 0,137 ccm N (21,5°, 757 mm korr.).
10,869 mg Substanz gaben 8,770 mg $BaSO_4$.
19,944 mg Substanz gaben 9,208 mg K_2SO_4.

$C_{11}H_{11}O_{10}N_2S_2K_3 + 1\ C_2H_5OH$ (558,55).
Ber. C 27,93% N 5,00% S 11,48% K 21,00%
Gef. C 27,65% N 4,76% S 11,08% K 20,23%.

Die Substanz ist hygroskopisch, in Wasser sehr leicht löslich, auch etwas löslich in Alkohol.

6. Kaliumsalz der N,N',N''-Histidyl-histidentrisulfonsäure.



$+ H_2O$.

In diesem Falle läßt sich als Ausgangsmaterial zur Sulfonierung nicht das isolierte Peptid darstellen wie in den vorhergehenden Versuchen. Das freie Histidyl-histidin existiert nach Fischer nur in Lösung, und er hat es nur in Form seines Pikrates isolieren können. Es werden nach der Vorschrift von Pauly und Fischer [34]) 1,6 g Histidinanhydrid dargestellt. Dieses wird nun zum Peptid aufgespalten, indem es mit 85 ccm

[34]) E. Fischer, ges . Werke, herausg. v. M. Bergmann; Unters. über Aminosrn., Polypept. und Proteine I (99/06), S. 450.

n-Kalilauge sechs Stunden auf der Maschine geschüttelt und dann einen Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen wird. Zur Abstumpfung des freien Alkalis wird jetzt ungefähr 10 Minuten lang ein ziemlich heftiger Strom Kohlensäure eingeleitet.

Die nunmehr bicarbonat-alkalische Lösung des Histidyl-histidins wird im Vakuum auf ungefähr 20 ccm eingedampft und zur Sulfonierung mit 4,5 Mol N-Pyridiniumsulfonsäure $1^1/_2$ Stunden auf der Maschine geschüttelt. Zugabe von Kaliumcarbonat erübrigt sich, da genügend Alkali von der Darstellung her vorhanden ist. Nachdem das entstandene Kaliumsulfat und das Pyridin in der bekannten Weise entfernt sind, werden nochmals 3 Mol N-Pyridiniumsulfonsäure zugegeben. Man schüttelt $1^1/_2$ Stunden, saugt unverbrauchte N-Pyridiniumsulfonsäure und Kaliumsulfat ab und neutralisiert mit Essigsäure. Mit 15 ccm absolutem Alkohol wird gelöstes Kaliumsulfat ausgefällt, davon wird abgesaugt und das Filtrat mit 150 ccm absolutem Alkohol stehen gelassen. Erst ganz allmählich setzt sich ein gelbliches Oel, das als Emulsion vorhanden war, am Boden ab. Der überstehende Alkohol wird abdekantiert, und schon nach einmaligem Verreiben mit absolutem Alkohol zerfällt das Öl zu einem schwach gelblich gefärbten, kristallinen Pulver. Dieses wird mit Alkohol und Äther nachgewaschen und im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknet. Die Ausbeute beträgt 1,9 g. Die Substanz war noch ein wenig mit Kaliumsulfat verunreinigt. Sie wurde in 2 ccm Wasser gelöst und mit 2 ccm absolutem Alkohol versetzt, um das Kaliumsulfat abzuscheiden, und dann mit Alkohol ausgefällt.

Die nun analysenreine Substanz wurde erst bei 56° vorgetrocknet und schließlich bei 100° bis zur Gewichtskonstanz gebracht.

0,1112 g Substanz gaben 0,0534 g K_2SO_4.
0,1306 g Substanz gaben 0,1270 g $BaSO_4$.
0,1229 g Substanz gaben 13,10 ccm N (23,5°, 746 mm, korr.).
0,1349 g Substanz gaben 0,0955 g CO_2.

$C_{12}H_{12}O_{12}N_6S_3K_4 + 1H_2O$ (702,6).

Ber. K 22,26% S 13,69% N 11,96% C 20,50%
Gef. K 21,55% S 13,36% N 12,04% C 20,12%.

Die Substanz ist stark hygroskopisch und sehr leicht löslich in Wasser.

Sulfonierung von Diketopiperazinen.

Das als Ausgangsmaterial dienende Diketopiperazin wurde nach der Methode von E. Fischer[35]) aus dem Glykokolläthylesterhydrochlorid durch Behandeln mit 11,5 n-Natronlauge hergestellt.

Zuerst wurde versucht, das Diketopiperazin auf dieselbe Weise zu sulfonieren wie die Peptide. Zu diesem Zweck wurden 1 g Diketopiperazin, 6,6 g Pottasche und 6 g N-Pyridiniumsulfonsäure in 15 ccm Wasser auf der Maschine geschüttelt. Dann wurde eine Probe des Reaktionsgemisches filtriert und mit überschüssigem Bariumchlorid versetzt, um

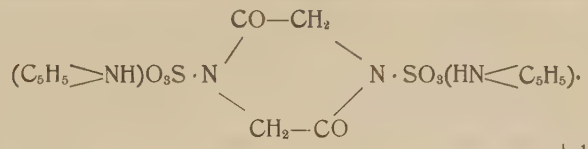
[35]) B. **39**, 2930(06).

Sulfat und Karbonat zu fällen. Das Filtrat säuerte man jetzt mit Salzsäure an und erhitzte es zum Sieden. Es erfolgte aber keine Fällung von Bariumsulfat, auch nicht auf Zusatz von Ammoniumnitrit. Also war das Diketopiperazin nicht sulfoniert worden.

Ein ähnlicher Versuch, der unter Verwendung von Leucyl-glycinanhydrid [36]) durchgeführt wurde, verlief gleichfalls, ohne daß das Ziel der Sulfonierung erreicht wurde.

Die bei den nun folgenden Versuchen gebrauchten N-Pyridiniumsulfonsäure wurde, um sie vollkommen wasserfrei zu erhalten — da sie ja bei höherer Temperatur verwendet wurde —, nach besonders gründlichem Auswaschen mit Eiswasser scharf abgesaugt, zunächst ungefähr 20 Minuten auf Ton an der Luft, dann im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet.

7. Pyridiniumsalz der N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure.



$+ {}^1/_2\, C_2H_5OH$

1,8 g feingepulvertes Diketopiperazin werden mit scharf getrockneter N-Pyridiniumsulfonsäure (8 g) innig vermischt und unter dauerndem Umrühren im Metallbad langsam erhitzt. Um 140° beginnt das Gemisch zu schmelzen und ist gegen 150° zu einer gleichmäßigen, klaren Schmelze geworden. Sie wird dann noch einige Minuten bei 155° unter Umrühren belassen, wobei sie langsam erstarrt. Der nach vollständiger Abkühlung sehr harte Schmelzkuchen wird im Mörser verrieben und dann auf dem Wasserbade mit absolutem Alkohol digeriert, um die unverbrauchte N-Pyridiniumsulfonsäure und etwa entstandenes Pyridiniumsulfat herauszulösen. Das Pyridiniumsalz der N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure bleibt ungelöst zurück. Ausbeute 6,3 g, das sind 90% der Theorie. Eine Probe der Substanz in Wasser gelöst, gibt auf Zusatz von salzsaurer Bariumchloridlösung in der Kälte nur eine sehr geringe Fällung von Bariumsulfat. Zwecks Entfernung der geringen Mengen verunreinigenden Sulfates wird die Substanz unter geringem Erwärmen in Wasser gelöst, und aus dem Filtrat wird dann mit absolutem Alkohol analysenreines Pyridiniumsalz gefällt. Es scheidet sich in weißen Kristallnadeln ab.

Die Analysensubstanz wird im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1256 g Substanz gaben 0,1274 g $BaSO_4$.
0,1513 g Substanz gaben 16,5 ccm N (19°, 757,4 mm korr.).

$C_{14}H_{16}O_8N_4S_2 + {}^1/_2\, C_2H_5OH$ (455,3).

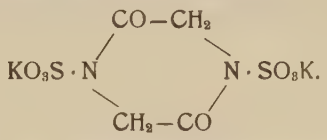
Ber. S 14,08% N 12,57%
Gef. S 13,97% N 12,70%.

[36]) Das Leucyl-glycinanhydrid wurde nach der Methode von E. Fischer gewonnen. B. 39, 2914(06).

Auch beim Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxyd bei 100° verlor die Substanz ihren Alkoholgehalt nicht. Der Alkohol wurde qualitativ mit der Essigester- und der Jodoformprobe nachgewiesen.

Die Substanz ist nicht hygroskopisch und in kaltem Wasser relativ schwer löslich. Mit salzsaurer Bariumchloridlösung erfolgt in der Kälte langsam, schnell beim Erhitzen, Fällung von Bariumsulfat, die nach kurzer Zeit schon quantitativ ist; auf Zugabe von Ammoniumnitrit wird sie nicht vermehrt.

8. Kaliumsalz der N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure.



Die Darstellung des Kaliumsalzes erfolgt am besten aus dem Pyridiniumsalz. Zu diesem Zweck schüttelt man 4,5 g (1Mol) des fein gepulverten Pyridiniumsalzes mit einer kalten gesättigten Lösung von 2,2 g (2,1 Mol) Kaliumbicarbonat, die man anteilweise hinzugibt. Man schüttelt solange, bis sich keine Kohlensäure mehr entwickelt; dann ist die Reaktion beendet und das Kaliumsalz quantitativ als feiner, weißer, kristallinischer Niederschlag ausgefallen. Verwendet man zur Darstellung nicht umgelöstes Pyridiniumsalz, so muß das Kaliumsalz zur vollständigen Reinigung noch aus Wasser umkristallisiert werden. Umkristallisiert erhält man das Kaliumsalz in feinen, weißen Nadeln.

Statt bei der Herstellung des Kaliumsalzes das dazu benötigte Pyridiniumsalz zu isolieren, kann man auch das Rohprodukt, wie es in der ursprünglichen Reaktionsschmelze vorliegt, direkt verwenden. Man verfährt z. B. so, daß 1 g fein gepulvertes Diketopiperazin mit 4 g N-Pyridiniumsulfonsäure in bekannter, oben beschriebener Weise zur Umsetzung gelangen. Das zerkleinerte Reaktionsgemisch wird nun mit einer eiskalten gesättigten Lösung von 2,1 Mol Kaliumbicarbonat anteilweise versetzt. Es entwickelt sich Kohlensäure, und das Kaliumsalz der Diketopiperazindisulfonsäure scheidet sich als schwerlösliches Salz aus. Seiner Darstellung aus dem mit Pyridiniumsulfat und Pyridiniumsulfonsäure verunreinigten Pyridiniumsalz gemäß enthält dieses Produkt natürlich stets Kaliumsulfat als Verunreinigung. Durch einmaliges Umkristallisieren aus Wasser ist es aber analysenrein zu erhalten.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1496 g Substanz gaben 0,0734 g K_2SO_4.
0,1613 g Substanz gaben 0,2116 g $BaSO_4$.
0,1417 g Substanz gaben 10,20 ccm N (22°, 763 mm, korr.).
0,1081 g Substanz gaben 0,053 g CO_2.

$C_4H_4O_8N_2K_2S_2$ (350,39).

Ber. K 22,32% S 18,31% N 8.00% C 13,70%
Gef. K 22,01% S 18,43% N 8,20% C 13,37%.

Um bei der C-Bestimmung, die ebenfalls auf flüssigem Wege nach der Methode von Messinger vorgenommen wurde, eine vollständige Verbrennung der Substanz herbeizuführen, mußte ein Tropfen Quecksilber als Katalysator hinzugegeben werden.

Die Umsetzung des Pyridiniumsalzes zum Kaliumsalz läßt sich auch anstelle von Kaliumbicarbonat mit Kalilauge durchführen. Doch muß man in diesem Falle mit genau berechneten Mengen arbeiten, da wegen der unten beschriebenen Aufspaltung der Diketopiperazindisulfonsäure durch Kalilauge ein Überschuß an Lauge streng vermieden werden muß. Am besten verfährt man so, daß 4,5 g Pyridiniumsalz in der gerade genügenden Menge Wasser gelöst und mit einer alkoholischen Lösung von 1,1 g Kalilauge langsam unter Umrühren versetzt werden. Es fällt sofort das reine Kaliumsalz als weißer kristallinischer Niederschlag aus. Ausbeute 3,8 g, das sind fast 100% der zu erwartenden Menge.

Das so erhaltene, im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknete Kaliumsalz kristallisiert mit einem Molekül Alkohol, der qualitativ als Essigester nachgewiesen werden kann.

0,1025 g Substanz gaben 0,1177 g $BaSO_4$.

$$C_4H_4O_8N_2K_2S_2 + 1\ C_2H_5OH\ (396{,}44).$$

Ber. S 16,18%
Gef. S 15,76%.

Kristallisiert man aber das alkoholhaltige Kaliumsalz aus Wasser um, so erhält man jetzt wieder das alkohol- und wasserfreie Kaliumsalz.

0,1011 g Substanz gaben 0,1335 g $BaSO_4$.

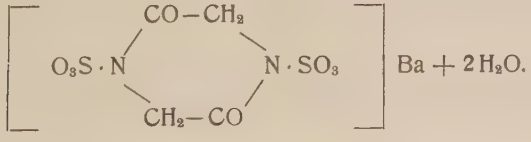
$$C_4H_4O_8N_2K_2S_2\ (350{,}39).$$

Ber. S 18,31%
Gef. S 18,14%.

Die wässrige Lösung des Kaliumsalzes reagiert neutral. Angesäuert, z. B. mit Salzsäure, zerfällt es in der Kälte langsam, rasch beim Erhitzen unter Abspaltung von Schwefelsäure, die als Bariumsulfat nachgewiesen wird. Die Abspaltung erfolgt quantitativ und ohne Bildung einer Glycin- oder Glycyl-glycinsulfonsäure, denn auch bei längerem Kochen der zuvor nur kurze Zeit erhitzten salzsauren, von Bariumsulfat abfiltrierten Lösung erfolgt selbst nach Zugabe von Ammoniumnitrit keine weitere Bildung von Schwefelsäure.

Die konzentrierte wässrige Lösung des Kaliumsalzes gibt mit Kupfersulfatlösung keinen Niederschlag. Auch bei Silbernitrat entsteht zunächst keine Fällung, doch bildet sich beim Stehen über Nacht eine geringe Menge eines schwer löslichen Niederschlages. Leicht fällt dagegen auf Zusatz von Bariumchloridlösung das Bariumsalz .

9. Bariumsalz der N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure.



1 g Kaliumsalz werden in wenig heißem Wasser gelöst und mit einem Überschuß von heißer 10-prozentiger Bariumchloridlösung versetzt. Es fällt das Bariumsalz als weißer, in feinen Nädelchen kristallisierender Niederschlag aus. Es wird abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser ausgewaschen und im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknet. Ausbeute 1,2 g statt der theoretischen Ausbeute von 1,3 g.

0,1496 g Substanz gaben 0,1600 g $BaSO_4$.
0,1802 g Substanz gaben 0,0950 g $BaSO_2$.
0,1045 g Substanz gaben 5,81 ccm N (19°, 761 mm, korr.).

$C_4H_4O_8N_2S_2Ba_1 + 2\ H_2O$ (445,62).

Ber. S 14,39% Ba 30,83% N 6,29%
Gef. S 14,69% Ba 31,09% N 6,50%.

Aufspaltung der N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure in alkalischer Lösung.

Die Aufspaltung des Kaliumsalzes der N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure wurde zunächst titrimetrisch verfolgt, und zwar unter Verwendung von CO_2-freier Kalilauge und Phenolphtaleïn als Indikator. Phenolphthaleïn kann deswegen verwendet werden, weil sowohl das Kaliumsalz der N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure als auch das Kaliumsalz der N,N'-Glycyl-glycindisulfonsäure und das Kaliumsalz der N-Glycylmonosulfonsäure gegen Phenolphtaleïn völlig neutral reagieren. Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß man das Kaliumsalz mit 2—5 Mol Kalilauge über verschiedene Zeiträume unter Luftabschluß stehen ließ und nun mit Oxalsäure den dann jeweils vorhandenen Überschuß an Kalilauge zurücktitrierte.

Versuch 1: Zu 68 mg Kaliumsalz wurden 5,55 ccm n/10 Kalilauge (entsprechend 1 Mol Substanz zu 3 Mol Lauge) gegeben. Man schüttelte, bis nach 10 Minuten Lösung eingetreten war und titrierte sofort mit n/10 Oxalsäure zurück. Da dazu 3,7 ccm Oxalsäure nötig waren, so waren also 1,85 ccm n/10 Kalilauge zur Aufspaltung des Kaliumsalzes verbraucht worden, was genau einem Mol Lauge entspricht. Im Zusammenhang mit der weiter unten beschriebenen Isolierung des Kaliumsalzes der N,N'-Glycyl-glycindisulfonsäure heißt das, daß das Kaliumsalz der N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure quantitativ zu jener Verbindung aufgespalten worden ist.

Versuch 2: Es wurden zu 140,6 mg Kaliumsalz 7,6 ccm n/8 Kalilauge (entsprechend 1 Mol Substanz zu 2 Mol Lauge) gegeben. Nach 2 Stunden wurden zur Rücktitration 2,4 ccm n/10 Oxalsäure verbraucht. Dies würde einer vollständigen Aufspaltung des Kaliumsalzes der Diketopiperazindisulfonsäure zum Kaliumsalz der Glycyl-glycindisulfonsäure, welches seinerseits zu 50% zum Kaliumsalz der Glycinsulfonsäure weiter abgebaut wird, entsprechen.

Versuch 3 wurde ganz entsprechend wie Versuch 2 angesetzt. Die hier verwandten Mengen waren: 129,4 mg Kaliumsalz und 7 ccm n/8 Kalilauge. Einwirkungsdauer 2 Stunden. Nach dieser Zeit wurden 2,3 ccm

Oxalsäure verbraucht, das heißt von dem quantitativ entstandenen Kaliumsalz der Glycyl-glycindisulfonsäure sind noch 47,4% zum Kaliumsalz der Glycinsulfonsäure aufgespalten worden.

Versuch 4: Zu 107,6 mg Kaliumsalz wuden 8,72 ccm n/10 Kalilauge (entsprechend 1 Mol Substanz zu 3 Mol Lauge) gegeben. Zur Rücktitration wurden nach $2^1/_2$ Stunden 4,3 ccm n/10 Oxalsäure verbraucht, d. h. von dem zuerst entstandenen Kaliumsalz der Glycyl-glycindisulfonsäure sind 50% zum Kaliumsalz der Glycinsulfonsäure aufgespalten worden.

Versuch 5: Zu 138,8 mg (1 Mol) Kaliumsalz wurden 7,4 ccm (2 Mol) n/10 Kalilauge gegeben. Man schüttelte, bis Lösung eingetreten war und ließ die Reaktionsflüssigkeit gut verschlossen 24 Stunden stehen. Dann wurde mit n/10 Oxalsäure zurücktitriert. Es wurden 0,6 ccm Oxalsäure verbraucht. Das entspricht einer annähernd quantitativen Aufspaltung des Kaliumsalzes der Diketopiperazindisulfonsäure zum Kaliumsalz der Glycinsulfonsäure.

10. Kaliumsalz der N,N'-Glycyl-glycindisulfonsäure.

$$SO_3K \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot N(SO_3K) \cdot CH_2 \cdot COOK + 2\ H_2O.$$

1,5 g Kaliumsalz der N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure werden mit 34,3 ccm (1 Mol) n 8 CO_2-freier Kalilauge geschüttelt. Nach ungefähr 10 Minuten ist Lösung eingetreten und damit die Reaktion beendet. Man versetzt jetzt mit absolutem Alkohol, wobei sich das Aufspaltungsprodukt als farbloses Öl abscheidet, das sich allmählich am Boden absetzt und nach mehrmaligem Verreiben mit frischem absoluten Alkohol zu einem weißen, kristallinen Pulver erstarrt. Man saugt ab, wäscht mit Alkohol und Äther nach und bringt noch ätherfeucht in einen Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd. Die Ausbeute betrug 1,7 g, fast 100% der Theorie.

Zur Analyse wurde die Substanz über Phosphorpentoxyd bei 56° vorgetrocknet und bei 100° zur Gewichtskonstanz gebracht.

0,0863 g Substanz gaben 0,0541 g K_2SO_4.
0,0825 g Substanz gaben 0,0907 g $BaSO_4$
0,0959 g Substanz gaben 5,7 ccm N (23°, 736,7 mm, korr.).
0,1378 g Substanz gaben 0,0559 g CO_2.

$$C_4H_5O_2N_2S_2K_3 + 2\ H_2O (424,5).$$

Ber. K 27,63% S 15,11% N 6,60% C 11,30%
Gef. K 28,13% S 15,10% N 6,64% C 11,06%.

Die Substanz ist sehr hygroskopisch und in Wasser leicht löslich. Sie reagiert neutral. Kocht man eine Probe in salzsaurer Lösung unter Zusatz von überschüssigem Bariumchlorid kurz auf, so erfolgt Bariumsulfatfällung, die schon nach 1—2 Minuten sich kaum mehr vermehrt. Filtriert man jetzt ab und kocht nun das Filtrat nach Zugabe von Ammoniumnitrit, so tritt erneut eine Fällung von Bariumsulfat auf.

11. Kaliumsalz der N-Glycinsulfonsäure.

$KSO_3 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOK + H_2O$.

2 g Kaliumsalz der N,N'-Diketopiperazindisulfonsäure werden bis zur Auflösung in 91,5 ccm (2 Mol) n/8 CO_2-freier Kalilauge geschüttelt. Man läßt die Lösung 24 Stunden stehen und fällt dann mit absolutem Alkohol das Kaliumsalz der N-Glycinsulfonsäure aus. Dieses fällt anfangs ölig, aber erstarrt sehr bald zu einem weißen, kristallinen Pulver. Ausbeute 2,5 g, das sind 100% der Theorie.

Die Analysensubstanz wurde im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,0962 g Substanz gaben 0,0672 g K_2SO_4.
0,1219 g Substanz gaben 0,1165 g $BaSO_4$.
0,1110 g Substanz gaben 5,9 ccm N (24°, 746,9 mm, korr.).

$C_2H_3O_5N_1S_1K_2 + H_2O$ (249,31).

Ber. K 31,37% S 12,86% N 5,62%
Gef. K 31,35% S 13,13% N 6,01%.

Die Identität der erhaltenen Substanz mit dem Kaliumsalz der N-Glycinsulfonsäure wurde durch die Darstellung des Kupfer-Kaliumsalzes der N-Glycinsulfonsäure bestätigt. Eine konzentrierte wässrige Lösung des Aufspaltungsproduktes wurde mit einer konzentrierten wässrigen Lösung von Kupferacetat zusammengebracht und darauf mit viel Alkohol versetzt. Es fiel anfangs ein blaues Öl, das sehr rasch zu einem blauen, kristallinischen Pulver erstarrte[37]).

Vergleichende Aufspaltungsversuche der Kaliumsalze der Peptidsulfonsäuren und der freien Peptide mit n/8 Kalilauge.

Das Peptid, bezw. das Kaliumsalz des sulfonierten Peptides, wird in 1 Mol CO_2-freier n/8 Kalilauge gelöst und 2 Stunden bei Zimmertemperatur (23°) unter Luftabschluß aufbewahrt. Dann wird nach der Methode von R. Willstätter und Waldschmidt-Leitz[38]) in 97-proz. alkoholischer Lösung mit Phenolphtaleïn als Indikator das Ergebnis der Einwirkung der Lauge titrimetrisch bestimmt.

Bei dem unsulfonierten Peptid können infolge der Hydrolyse aus 1 Mol Peptid 2 oder mehrere Mole freier Aminosäuren gebildet werden. Den so bedingten Zuwachs an Carboxylgruppen bestimmt man eben nach der erwähnten Methode durch Titration mit CO_2-freier n/8 Kalilauge. Auch bei der Aufspaltung der Kaliumsalze der sulfonierten Peptide werden bei der Hydrolyse Carboxylgruppen frei, die aber durch die Kalilauge abgesättigt werden und im Verfahren nach R. Willstätter und Waldschmidt-Leitz durch Rücktitration der noch vorhandenen überschüssigen Kalilauge mit Oxalsäure bestimmt werden müssen. (In den folgenden Versuchen kam n/10 Oxalsäure zur Verwendung.)

---

[37]) Dissertation Ilse Marggraff, S. 18; Chem. Inst. d. Univ. Berlin (30).
[38]) B. **54**, 2988(22).

Die zugegebene Menge absoluten Alkohols bei diesen Titrationen bestimmt sich gemäß der Forderung, daß bei erfolgter Titration eine ca. 97-proz. alkoholische Lösung vorliegen muß. Als Indikator dient 1-proz. Phenophtaleïnlösung, von der je 1 ccm auf 100 ccm des Alkohols verwendet werden.

Versuchsergebnisse.

A. Aufspaltung unsulfonierter Peptide.

	Peptid mg	KOH ccm zugegb.	Alk.+Phen. ccm	KOK ccm verbr.	aufgesp. Pept. Gew. %
Glycyl-glycin	131,2	8	500 A. 5 Ph.	0,7	10
Diglycyl-glycin	90,1	3,85	300 A. 3 P.h	0,55	14
Leucyl-glycin	175,3	7,5	500 A. 5 Ph.	0 6	8

B. Aufspaltung der Kaliumsalze der sulfonierten Peptide.

	Peptid mg	KOH ccm zugegb.	Alk.+Phen. ccm	Oxals. ccm verbr.	aufg. Pept. Gew. %
K-Salz des sulf. Glycyl-glycins	132,5	3,3	250 A. 2,5 Ph.	1,1	60
K-Salz des sulf. Diglycyl-glycins	137,0	3,05	250 A. 2,5 Ph.	2,65	14,2
K-Salz des sulf. Leucyl-glycins	148,2	3,15	250 A. 2,5 Ph.	3	10

Vorliegende Arbeit ist auf Anregung und unter Leitung von Herrn Privatdozenten Dr. P. Baumgarten in der Zeit vom Dezember 1928 bis Dezember 1930 im Chemischen Institut der Universität Berlin ausgeführt worden.

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle Herrn Privatdozenten Dr. Baumgarten für die Anregung und freundliche Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit herzlichst zu danken.

Lebenslauf.

Am 10. September 1902 bin ich, Else Dammann, in Berlin als Tochter des 1931 verstorbenen Stadtobertierarztes Ernst Dammann, geboren. Nach Beendigung der Schulausbildung mit dem Abiturium der staatlichen Elisabeth-Oberrealschule besuchte ich von Ostern 1922 bis Ostern 1923 die Seminarklasse des Oberlyceums derselben Anstalt. Im April 1923 ließ ich mich an der Friedrich-Wilhelms-Universität in Berlin immatrikulieren, um Mathematik und Naturwissenschaften, insbesondere Chemie, zu studieren. Im Juni 1926 und im Mai 1928 legte ich das chemische Verbandsexamen bei Herrn Hofrat Prof. Dr. Schlenk ab, im Oktober 1928 bestand ich das physikalisch-chemische Verbandsexamen bei Herrn Prof. Dr. Bodenstein. Im Dezember 1928 begann ich mit der Ausführung vorliegender Dissertation bei Herrn Privatdozenten Dr. Baumgarten im Chemischen Institut der Universität, die im Dezember 1930 beendet war. Im Dezember 1930 wurde ich exmatrikuliert.

Ich besuchte die Uebungen und Vorlesungen der Herren Professoren und Dozenten: Baumgarten, Bergmann, Bieberbach, Blasius, Bodenstein, Caspari, Dessoir, Freundlich, Hettner, Köhler, Leuchs, Löwner, Paneth, H. Pringsheim, P. Pringsheim, Scegö, Schlenk, Schmidt, Schur, Thoms, Tiede, Wehnelt.